

癌細胞において胆汁酸輸送によりPPAR がCOX-2転写誘導を活性化する

著者	大塩 博
号	2184
発行年	2005
URL	http://hdl.handle.net/10097/22766

氏 名（本籍）	おお 大 しお 塩 ひろし 博
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 2 1 8 4 号
学位授与年月日	平 成 17 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学 位 論 文 題 目	Peroxisome proliferator-activated receptor α activates cyclooxygenase-2 gene transcription through bile acids transport in human cancer cell lines （癌細胞において胆汁酸輸送により PPAR α が COX-2 転写誘導を活性化する）

（主 査）

論 文 審 査 委 員	教授 松 野 正 紀	教授 下瀬川 徹
	教授 竹 島 浩	

論文内容要旨

背景

cyclooxygenase-2 (COX-2) は各種サイトカインなどの生理活性物質の刺激により誘導され、癌細胞の発生・増殖・進展との関係が示唆されている。近年、我々は胆汁酸などの有機アニオンを細胞内に輸送する liver-specific organic anion transporter-2 (LST-2/SLCO1B3/OATP8) を単離し、肝細胞類洞側に発現している事を明らかにした。LST-2 は大腸癌、膵癌、胃癌、胆管癌等に異所性の発現を認めており、COX-2 同様、癌細胞の増殖、進展への関与が示唆されている。近年、細胞内に取り込まれた胆汁酸は各種核内受容体と結合し自身の輸送・代謝に関与する遺伝子群の転写発現調節を司ることが判明し、生理活性物質としての胆汁酸が注目されている。また現在のところ胆汁酸による発癌や癌の進展が示唆されているが、胆汁酸の輸送や標的分子などの機序は不明である。今回、LST-2 の輸送する胆汁酸による cyclooxygenase-2 (COX-2) 遺伝子の転写調節への関与を検討し、癌組織における胆汁酸トランスポーター LST-2 の関与の解明、それを応用した創薬規治療戦略の開発を目指し以下の実験を施行した。

方法

LST-2, COX-2 を発現しているヒト大腸癌細胞由来培養細胞株 HCT 116 を解析に用いた。ルシフェラーゼ解析にて各種胆汁酸添加およびトランスポーター発現の有無による COX-2 遺伝子転写活性化機構を検討した。

結果

1) COX-2 上流域におけるルシフェラーゼ解析にてリトコール酸 (LCA), デオキシコール酸 (DCA), ケノデオキシコール酸 (CDCA) 添加で COX-2 遺伝子転写活性の上昇を認めた。一方、タウロコール酸, コール酸転写活性は上昇しなかった。2) Northern blot analysis で胆汁酸濃度依存性の COX-2 の mRNA の増加を認めた。3) 欠失変異体によるルシフェラーゼ解析にて CCAAT enhancer binding protein (C/EBP) site, cyclic AMP response element (CRE) site が胆汁酸反応性転写調節領域である可能性が示唆された。4) 点突然変異体によるルシフェラーゼ解析にて CRE 領域に mutation を入れることにより最も LCA での反応の低下が認められた。5) LST-2 非発現細胞に LST-2 強発現アデノウイルスにて LST-2 を強制発現させた場合、LCA, DCA, CDCA 添加後の COX-2 遺伝子転写活性の有意な上昇を認めたため胆汁酸が細胞内に取り込まれることが重要であることが明らかとなった。6) CRE 領域を probe とした Electrophoretic Mobility Shift Assay 施行にて胆汁酸添加濃度依存性に増加する DNA

binding protein の存在が示唆され、同領域が胆汁酸反応性転写調節領域である可能性が示唆された。7) Super Shift Assay 施行にて PPAR α , CREB 抗体添加による specific band の移動度の変化を認め CRE 領域結合する転写因子複合体の中に PPAR α , CREB の存在が明らかとなった。8) PPAR α の特異的合成 Ligand (WY 14643) 添加にてルシフェラーゼ活性の上昇を認めた。さらに、CRE 領域の点突然変異体によるルシフェラーゼ解析にて WY 14643 添加によるルシフェラーゼ活性の上昇が抑制されたことにより CRE 領域が PPAR α 調節領域である可能性が示唆された。9) TransSilent PPAR α siRNA vector 導入によるルシフェラーゼ解析に胆汁酸添加によるルシフェラーゼ活性の上昇を抑制した。よって PPAR α が胆汁酸添加による COX-2 誘導の keymolecule である可能性が強く示唆された。

結 語

癌組織において異所性に発現する胆汁酸トランスポーター LST-2 は、胆汁酸を細胞内に輸送することにより COX-2 の転写活性を上昇させる重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに細胞内に輸送された胆汁酸は核内レセプター PPAR α , CREB 等の転写因子を介して、生理活性物質として自身が COX-2 転写誘導に関与していると考えられた。よって、これらの基序により胆汁酸トランスポーター LST-2 は大腸癌の胆汁酸癌や癌の進展に関与する可能性が示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

cyclooxygenase-2 (COX-2) は各種サイトカインなどの生理活性物質の刺激により誘導され、癌細胞の発生・増殖・進展との関係が示唆されている。近年、阿部等は胆汁酸などの有機アニオンを細胞内に輸送する liver-specific organic anion transporter-2 (LST-2/SLCO1B3/OATP8) を単離し、肝細胞類洞側に発現していることを明らかにした。LST-2 は大腸癌、膵癌、胃癌、胆管癌等に異所性の発現を認めており、COX-2 同様、癌細胞の増殖、進展への関与が示唆されている。近年、細胞内に取り込まれた胆汁酸は各種核内受容体と結合し、自身の輸送・代謝に関与する遺伝子群の転写発現調節を司ることが判明し、生理活性物質としての胆汁酸の役割が注目されている。さらに Farnesoid X receptor (FXR) や Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) 等の核内レセプターはお互いに関与しながら活性作用を示すとの報告も散見される。また現在のところ胆汁酸による発癌や癌の進展が示唆されているが、胆汁酸の輸送や標的分子などの機序は不明である。今回、申請者大塩博君は LST-2 の輸送する胆汁酸による cyclooxygenase-2 (COX-2) 遺伝子の転写調節への関与を検討し、癌組織における胆汁酸トランスポーター LST-2 の関与の解明、それを応用した創薬と新規治療戦略の開発を目指し以下の知見を明らかとした。癌組織において異所性に発現する胆汁酸トランスポーター LST-2 は、胆汁酸を細胞内に輸送することにより COX-2 の転写活性を上昇させる重要な役割を果たしていること、さらに細胞内に輸送された胆汁酸は核内レセプター FXR, PPAR α , CREB 等の転写因子を介して、生理活性物質として自身が COX-2 転写誘導に関与していること、これらの基序により胆汁酸トランスポーター LST-2 は大腸癌の胆汁酸発癌や癌の進展に関与する可能性を解明した。これらは極めて新規性が高く本研究の成果により、LST-2 さらには PPAR α を用いて消化器固形癌を選択的ターゲットにした創薬の開発の可能性もあり、化学療法の副作用を劇的に改善する可能性があり多くの消化器癌患者を社会的にも有意義であると考えられる。

申請者大塩博君は、大学院では肝胆膵を中心に臨床修練の傍ら、分子生物学・病理形態学の手法を用いてトランスポーター研究を遂行し多くの成果を挙げ、その機能を明らかにしてきた。彼は LST-2 の癌細胞から本研究に参画し、分子生物学的手法を踏まえたうえで極めて優れた能力を発揮し、グループの中心として研究を遂行した。

癌領域におけるトランスポーター研究は、薬剤耐性に関与する ABC トランスポーターファミリーに関する研究がほとんどであったが、本研究は、抗癌剤の細胞内への輸送や副作用の起きる送達メカニズムを明らかにした点で申請者の発想は極めて独創的である。その成果は大いに評価されるものであり、学位論文に値するといえる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。